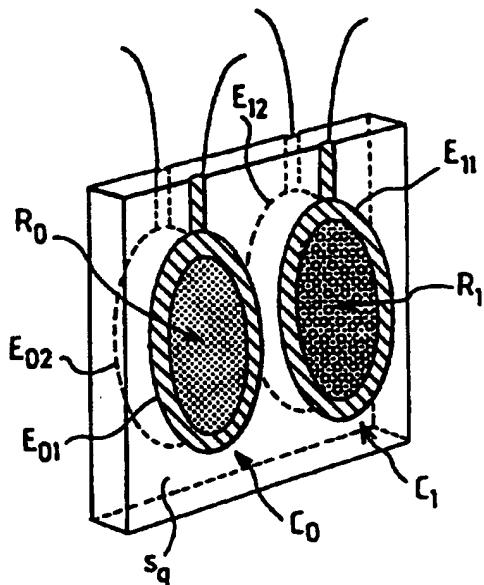




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/04, G01N 17/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/12990 (43) Date de publication internationale: 10 avril 1997 (10.04.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01515</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 septembre 1996 (27.09.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/11493 29 septembre 1995 (29.09.95) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): THOMSON-CSF [FR/FR]; 173, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et</p> <p>(75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): LIPSKIERN, Jean-François [FR/FR]; Thomson-CSF S.C.P.I., Boîte postale 329, F-92402 Courbevoie Cédex (FR).</p> <p>(74) Mandataire: THOMSON-CSF S.C.P.I.; Boîte postale 329, F-92402 Courbevoie Cédex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: DEVICE FOR DETECTING AND CONTROLLING BIOFILMS</p> <p>(54) Titre: DISPOSITIF DE DETECTION ET DE CONTROLE DE BIOFILMS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A device for detecting and controlling a biofilm being formed on a surface exposed to a moist environment. The device includes at least two microsensors (C_0, C_1) of which one has a biofilm-neutral surface exposed to the moist environment while another has a biofilm formation-inhibiting surface exposed to the moist environment. The device further includes differential measurement means between the two microsensors. The inhibitory effect of the exposed surface may be provided by antibiotic agents that are active against microorganisms in the biofilm. The device may be used in a water supply system.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un dispositif de détection et de contrôle de biofilms se formant sur une surface en contact avec un milieu humide. Le dispositif comprend au moins deux micro-capteurs (C_0 et C_1), l'un possédant une surface de contact avec le milieu humide, neutre vis-à-vis du biofilm, un autre possédant une surface de contact avec le milieu humide, inhibant la formation de biofilm. Le dispositif comprend également des moyens de mesure différentielle entre les deux micro-capteurs. L'inhibition de la surface de contact peut notamment être assurée par des agents antibiotiques actifs vis-à-vis des micro-organismes présents dans le biofilm. Application: système de distribution d'eau.</p>			



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KR	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Denemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

DISPOSITIF DE DETECTION ET DE CONTROLE DE BIOFILMS

Le domaine de l'invention est celui des micro-capteurs permettant 5 la détection et le contrôle de biofilms susceptibles de se former sur tout type de surface en contact avec un milieu humide et notamment au niveau des canalisations dans lesquelles s'écoulent un milieu aqueux.

De manière générale, les biofilms sont des structures formées par 10 des bactéries ou d'autres micro-organismes, qui se déposent sur les surfaces exposées à l'humidité et sécrètent des polyosides formant une matrice glycidique extrêmement résistante à l'abrasion. Cette matrice renforce l'adhérence des bactéries à la surface et les protège contre les agents chimiques, en particulier les désinfectants (Bryers, J.D., Colloids Surf. B:Biointerfaces, 1994, 2 (1-3), 9-23). De tels films se forment en 15 particulier sur les parois des conduits des réseaux d'adduction d'eau potable, et sont souvent responsables d'une dégradation de la qualité de l'eau. Ainsi, l'apparition d'un goût désagréable peut résulter de la sécrétion de molécules organiques solubles telles que la géosmine ou l'isobornéol. Par ailleurs, on observe généralement une augmentation de la concentration 20 de micro-organismes éventuellement pathogènes, ainsi que l'apparition d'une micro-flore et d'une micro-faune (protozoaires, petits crustacés, vers ...). Enfin, ces biofilms peuvent être responsables d'une corrosion accélérée des installations. Ce dernier problème se rencontre non seulement dans les réseaux de distribution d'eau potable, mais aussi dans des installations 25 industrielles telles que les systèmes d'injection d'eau dans les puits de pétrole (Ferris, F.G. et al. Can. J. Microbiol, 1992, 38(2), 1320-1324) ou les échangeurs de chaleur. Dans ces derniers, la formation de biofilms réduit en outre l'efficacité des transferts thermiques, on accroît les pertes de charges, diminuant ainsi notablement le rendement des installations (Shelton, D.R. 30 and Tiedje, J.M. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48, 840-848).

La formation de biofilms bactériens est également observée dans les systèmes de distribution d'eau désionisée utilisés dans de nombreux secteurs de l'industrie et de la recherche (Richardson Z., Proc. 5th Int. SAMPE Electronics Conf., June 18-20, 1992, 552-558). De nombreux 35 micro-organismes ont une structure suffisamment déformable pour pouvoir passer à travers les pores des filtres utilisés dans ces systèmes. Le

problème est particulièrement aigu dans l'industrie électronique. Diverses espèces chimiques sécrétées par ces micro-organismes sont sources d'impuretés qui peuvent affecter dramatiquement les performances des semi-conducteurs (J.E. Martyak, J.C. Carmody, G.R. Husted,

5 Microcontamination, 1993, 11 [1], 39-44).

Pour toutes ces raisons, on cherche actuellement à disposer de moyens permettant de détecter très rapidement la formation de biofilms et d'en mesurer l'évolution.

Plusieurs solutions ont été à ce jour proposées :

10 Une des méthodes utilisées pour évaluer l'importance de la contamination bactérienne et de la formation d'un biofilm consiste à prélever mécaniquement un échantillon, puis à cultiver les bactéries prélevées dans un milieu gélosé. On effectue ensuite un dénombrement par les techniques usuelles de microbiologie. Cette méthode présente un certain nombre 15 d'inconvénients.

En premier lieu, le prélèvement d'échantillons est difficile et peu 20 reproductible, en raison de l'excellente adhérence du film bactérien sur la plupart des matériaux usuels ; de plus, un tel prélèvement n'est pas toujours réalisable en pratique, par exemple dans le cas d'installations enterrées ou d'accès difficile.

En second lieu, les bactéries formant le biofilm se développent dans un milieu défavorable, pauvre en nutriments, et sont soumises à diverses agressions tels que chocs thermiques, osmotiques (concentration saline variable, dessiccation), ou chimiques (présence possible d'agents 25 désinfectants). Par suite, elles développent un certain nombre de mécanismes de résistance. En particulier, leur métabolisme se ralentit, et le temps nécessaire au doublement de leur population s'accroît dans des proportions difficiles à évaluer. Enfin, ces micro-organismes perdent la 30 capacité de se développer sur les milieux de culture synthétiques utilisés en laboratoire. Pour ces raisons, l'importance de la contamination est fréquemment sous-évaluée.

La méthode est donc non seulement difficile d'emploi, mais également peu fiable.

Récemment, il a été proposé d'utiliser une méthode de cytométrie 35 en flux, fondée sur une mesure de fluorescence : un marqueur fluorescent

est synthétisé par les bactéries à partir d'un précurseur. L'intensité de fluorescence mesurée peut être, dans certaines conditions, corrélée au nombre de cellules bactériennes contenues dans l'échantillon. Cette technique permet de s'affranchir de l'étape de culture sur milieu gélosé 5 synthétique, et donc de prendre en compte la fraction de micro-organismes non cultivables. Toutefois, elle requiert toujours le prélèvement d'échantillons représentatifs, qui n'est pas toujours aisé ni même possible. De plus, elle nécessite l'ajout d'un réactif (précurseur du marqueur fluorescent) en quantités relativement importantes, ce qui peut constituer en 10 soi une contamination inacceptable.

Un capteur de biofilms miniaturisé, intégré sur silicium, a été décrit (Stenberg M., Stemme G., Kittilä G. Pedersen K., Sens. Actuators, 1988, 13(3), 203-221). Ce capteur mesure en fait la quantité de chaleur transférée par un fluide en mouvement, depuis une source de chaleur 15 (élément chauffant), vers une diode sensible à la température située en aval. Cette quantité de chaleur est affectée par la présence d'un biofilm à la surface du capteur, formant une barrière isolante s'opposant au transfert thermique. Quoique présentant un intérêt indéniable, ce capteur souffre des inconvénients suivants. En premier lieu, la mesure réalisée n'est pas 20 spécifique de la formation d'un biofilm. Un dépôt d'une autre nature (tartre par exemple), se traduit également par une réponse du capteur. Par ailleurs, une variation des conditions physiques de la mesure (température du milieu, viscosité du fluide, débit, force ionique, etc ...) peut donner lieu à une dérive du détecteur. Enfin la technologie requise pour la fabrication du dispositif est 25 coûteuse et encore peu répandue.

Dans ce contexte, l'invention a pour objet un dispositif de détection et de contrôle de biofilm se formant sur une surface S en contact avec un milieu humide, basé sur une mesure différentielle entre plusieurs micro-capteurs dont l'un au moins possède la propriété d'être neutre vis-à-vis du biofilm, ce dernier pouvant ainsi se former sur ledit micro-capteur, un autre micro-capteur possédant une surface de contact avec le milieu humide inhibant la formation de biofilm. Ce dernier micro-capteur constitue une référence à laquelle peut être comparée le signal fourni par le premier micro-capteur.

Plus précisément, l'invention a pour objet un dispositif de détection et de contrôle de biofilm se formant sur une surface S en contact avec un milieu humide, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins deux micro-capteurs C_0 et C_1 déposés sur la surface
- 5 S, le micro-capteur C_0 possédant une surface de contact avec le milieu humide, neutre vis-à-vis de la formation de biofilm, le micro-capteur C_1 possédant une surface de contact avec le milieu humide, munie d'un revêtement R_1 inhibant la formation de biofilm ;
- des moyens de mesure différentielle des différents micro-
10 capteurs.

Avantageusement, le micro-capteur C_0 peut posséder une surface de contact avec le milieu aqueux munie d'un revêtement de nature identique à celle de la surface S.

- Avantageusement, les micro-capteurs utilisés dans le dispositif de
- 15 l'invention peuvent être des capteurs sensibles à la masse de matière déposée à leur surface ; il peut typiquement s'agir de micro-capteurs à ondes acoustiques. Dans cette variante de l'invention, la masse liée à la surface du micro-capteur C_0 s'accroît au fur et à mesure qu'un biofilm se forme. Le micro-capteur C_1 ne mesure pas d'accroissement de masse
- 20 résultant de la formation d'un biofilm. En revanche tout phénomène physique ou chimique (en particulier les effets liés aux variations de température ou de densité de liquide) n'ayant pas de lien causal avec la formation ou la croissance d'un biofilm, influe sur la réponse des deux micro-capteurs C_0 et C_1 de la même façon. En comparant les signaux issus des deux micro-
25 capteurs, il est ainsi possible de s'affranchir des perturbations précitées ; la réponse obtenue est en effet corrélée de façon univoque à la formation et à la croissance du biofilm.

- Avantageusement, le revêtement R_1 peut comprendre un agent antibiotique inhibant la formation de biofilm pouvant être enfermé dans un
- 30 matériau hôte, adapté pour combattre un type précis de micro-organismes.

Avantageusement, le revêtement R_0 peut être constitué d'un matériau polymère hydrophobe et le revêtement R_1 peut comprendre un réseau interpénétré de macromolécules M_h dans une matrice de matériau polymère identique à celui du revêtement R_0 .

Afin d'élargir le champ de prospection du dispositif de détection et de contrôle de biofilm évoqué ci-dessus, l'invention a également pour objet un dispositif associant une pluralité de micro-capteurs $C_1, \dots, C_i, \dots, C_n$, munis de revêtements $R_1, \dots, R_i, \dots, R_n$ dans lesquels sont incorporés des agents antibiotiques différents, de façon à déterminer la nature des espèces contaminantes, responsables de la formation de biofilm.

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre non limitatif et grâce aux figures annexées, parmi lesquelles :

10 - la figure 1 illustre un exemple de dispositif selon l'invention utilisant deux micro-capteurs à ondes acoustiques de volume ;

- la figure 2 illustre un exemple de dispositif selon l'invention, utilisant deux micro-capteurs à ondes acoustiques de surface ;

- la figure 3 illustre un exemple de micro-capteur à ondes acoustiques de love, utilisé dans un exemple de dispositif selon l'invention ;

15 - la figure 4 illustre des formules chimiques d'agents introduits dans un exemple de revêtement R_1 et inhibant la formation de biofilm ;

- la figure 5 donne des exemples d'agents de surface utilisés dans des dispositifs selon l'invention.

20 Nous allons décrire l'invention dans le cadre de micro-capteurs à ondes acoustiques, qui présentent le double intérêt d'être particulièrement sensibles et de conception simple et adaptée aux applications visées (détection de biofilms dans des canalisations, ...). Néanmoins d'autres types de micro-capteurs peuvent être employés et notamment des micro-capteurs 25 tels que ceux décrits par Stenbeerg et al (évoqués dans l'art antérieur cité précédemment).

30 De façon générale, on distingue deux types de capteurs à ondes acoustiques : les capteurs à ondes acoustiques de volume et les capteurs à ondes acoustiques de surface. Les premiers sont souvent désignés par le signe BAW de l'anglais "Bulk Acoustic Waves". Les seconds sont souvent désignés par le sigle SAW ("Surface Acoustic Waves").

35 Les capteurs BAW sont généralement réalisés à partir d'une plaquette de matériau piézoélectrique tel que le quartz monocristallin, découpée selon certaines orientations correspondant à un fort couplage piézo-électrique associé à une faible sensibilité aux variations de

température. Des paires d'électrodes métalliques déposées de façon symétrique de part et d'autre de la plaquette permettent d'exciter et de détecter des ondes acoustiques se propageant dans la masse du matériau.

Selon le dispositif de l'invention, deux capteurs semblables C_0 et 5 C_1 sont associés. L'un, C_1 , est muni sur l'une de ses électrodes E_{11} , d'un film de matériau R_1 , inhibant la formation de biofilms. L'autre, C_0 , peut être laissé à nu, ou bien peut être avantageusement muni d'un film de matériau R_0 sur l'une de ses électrodes E_{01} , le matériau R_0 étant identique au matériau constituant les installations à surveiller, ou tout au moins de 10 composition et de structures chimiques très voisines.

A titre d'exemple, pour surveiller des canalisations en PVC, on pourra avoir avantage à déposer sur le capteur C_0 , un film de PVC de même nature. Par ailleurs, afin de minimiser les différences de fabrication et d'environnement entre C_1 et C_0 , on pourra avoir avantage à réaliser les 15 deux capteurs côte à côte sur un même substrat de quartz sq, comme l'illustre la figure 1, les contre-électrodes E_{02} et E_{12} des deux capteurs C_0 et C_1 étant de l'autre côté dudit substrat sq.

Dans une autre variante de l'invention, le dispositif de l'invention comprend des micro-capteurs à ondes de surface. Ces capteurs 20 comprennent deux séries d'électrodes interdigitées, déposées à la surface d'un matériau piézoélectrique. La figure 2 illustre un exemple de dispositif dans lequel les deux capteurs sont montés en parallèle, le capteur C_1 comprend deux séries d'électrodes SE_{11} et SE_{12} séparées d'une distance d , à la surface d'un matériau piézoélectrique, entre ces deux séries 25 d'électrodes, le revêtement R_1 est également déposé à la surface du matériau piézoélectrique. Le capteur C_0 comprend aussi deux séries d'électrodes interdigitées SE_{01} et SE_{02} , séparées de la même distance d que dans le capteur C_1 . Un revêtement R_0 peut avantageusement être déposé entre les deux séries d'électrodes SE_{01} et SE_{02} . L'ensemble des 30 capteurs C_0 et C_1 peut être réalisé sur un même substrat piézoélectrique, type quartz, sq.

Pour réaliser la fonction d'inhibiteur de formation de biofilm, deux types de matériaux peuvent être utilisés. Le premier type empêche l'adhésion des micro-organismes en modifiant l'énergie de surface du

substrat ; le second inhibe la croissance de colonies bactériennes par l'effet d'agents antibiotiques incorporés, diffusant lentement vers la surface.

a) Revêtements diminuant l'adhérence des cellules :

Dans cette approche qui s'applique particulièrement bien à des matériaux polymères, on cherche à diminuer le caractère hydrophobe de la surface à protéger en incorporant au substrat sq des agents tensioactifs ou surfactants. Des exemples de surfactants efficaces sont : le poly-(oxyde d'éthylène), ainsi que les copolymères blocs de type A-B-A où A est le poly-(oxyde d'éthylène) et B est le poly-(oxyde de propylène) connus de l'homme de l'art sous l'appellation "Pluronic" (marque déposée de BASF) ou "Synperonic" (marque déposée de ICI) ; des poly-ionènes tels que les poly-ammoniums quaternaires ou les poly-phosphonium. Ces surfactants peuvent être incorporés à la surface du substrat sq à protéger de différentes manières :

- on peut ainsi simplement incuber le substrat sq dans une solution aqueuse contenant le surfactant ; cette technique s'applique particulièrement bien dans le cas des agents de type Pluronic déposés sur des surfaces hydrophobes, en particulier sur des polymères tels que le PVC, le polystyrène, le PMMA ... : les blocs de type B, hydrophobes, adhèrent alors fortement à la surface, alors que les blocs de type A, hydrophiles, se projettent vers la phase aqueuse, formant une interface stériquement stabilisée ;

- une autre méthode, désignée par le sigle SPIN (Surface Physical Interpenetrating Networks), consiste à placer la surface du substrat sq à protéger en contact avec une solution de surfactant (par exemple du poly-(oxyde d'éthylène) dans un solvant commun ; on laisse diffuser le surfactant dans le substrat sq dont la surface est gonflée par le solvant, puis on effectue une trempe rapide dans un solvant du surfactant, non solvant du matériau ; le surfactant est ainsi incorporé à la surface du substrat, dans un état métastable) ;

- une troisième méthode consiste à utiliser des molécules intermédiaires capables de former des liaisons covalentes d'une part avec le substrat et d'autre part avec le surfactant. Cette approche s'applique non seulement à des substrats à base de matériaux polymères, mais aussi à des

surfaces métalliques, ou à des matériaux inorganiques, et en particulier au quartz.

Bien que les trois méthodes puissent être utilisées, on préférera la seconde ou la troisième, qui présentent l'avantage d'une meilleure 5 stabilité à long terme. En effet, le surfactant adsorbé sur la surface sq dans la première méthode, peut être dissous dans la phase aqueuse à la longue.

Exemple 1 de dispositif selon l'invention

Un détecteur est réalisé selon l'invention en associant deux capteurs à ondes acoustiques de volume C_0 et C_1 , revêtus d'un film de poly- 10 (chlorure de vinyle) (PVC) (Aldrich 34, 675-6, high molecular weight) réalisé par pulvérisation (spray coating) à partir d'une solution à 5 g.l^{-1} de PVC dans le tétrahydrofurane (THF), et recuit pendant 1h à 60°C . Le capteur C_1 est de plus incubé, selon une procédure adaptée de (Desai, N.P. et al., biomaterials, 1991, 12(2), 144-153), dans une solution contenant :

15 - du polyéthylène glycol (PEG) 17'500 (Fluka, $\text{Mr} \sim 15000-20000$) : 80 g.l^{-1}
- du THF : 40 %
- de l'eau désionisée : 60 %

portée à 50°C , pendant 15 minutes, puis trempé dans un excès 20 d'eau désionisée. A l'issue de ce traitement, des molécules de PEG sont incorporées de façon stable et durable à la surface du capteur C_1 . Le caractère hydrophile de cette dernière, comparée à la surface du PVC non traité (telle que celle du capteur C_0) peut être évalué par une mesure d'angle de contact d'une goutte d'eau sur le revêtement : l'angle est 25 sensiblement plus faible sur C_1 (25°) que sur C_0 (48°). La méthode peut être adaptée pour des capteurs revêtus de matériaux polymères divers, de préférence de même nature que ceux utilisés dans les installations à surveiller : polyuréthane, PET, PMMA, polystyrène, etc... Le tableau ci-après résume les conditions opératoires pouvant être utilisées en fonction 30 du matériau R_1 constituant le revêtement du capteur C_1 . Dans ce tableau, Σ_1 désigne le solvant à partir duquel ce matériau est déposé, Σ_2 le solvant (ou mélange de solvant) d'immersion contenant le PEG (concentration 80 g.l^{-1}), Σ_3 le solvant de trempe, H_2O désigne l'eau désionisée, THF le tétrahydrofurane, TFAA l'acide trifluoroacétique, AC l'acétone.

R_1	Solvant Σ_1 (film)	Solvant Σ_2 (PEG)	Solvant Σ_3 (trempe)
Polyuréthane	THF	THF/H ₂ O (40%/60%)	H ₂ O
PET	TFAA	TFAA/H ₂ O (20%/80%)	H ₂ O
PMMA	AC	AC/H ₂ O (60%/40%)	H ₂ O

Les capteurs ainsi traités présentent une surface hydrophile inhibant la fixation des cellules susceptibles de former un biofilm.

5

Exemple 2 de dispositif selon l'invention

Deux capteurs C_0 et C_1 utilisant les ondes acoustiques de Love, sont réalisés selon un procédé analogue à celui décrit dans (Gizeli, E. et al. Sens. Actuators B, 1992, 6, 131-137). Il s'agit de capteurs comprenant une couche intermédiaire entre le substrat piézoélectrique et le revêtement R_0 et/ou R_1 , dans laquelle la vitesse de propagation des ondes acoustiques est inférieure à celle des ondes acoustiques dans le matériau piézoélectrique. La figure 3 illustre ce type de capteur dans lequel des jeux d'électrodes interdigitées SE_{i1} et SE_{i2} sont déposés à la surface du substrat piézoélectrique et recouverts de la couche intermédiaire, et concerne plus précisément le micro-capteur C_1 .

Ainsi dans ce type de dispositif selon l'invention, ces capteurs comprennent un substrat de quartz sur lequel est déposé une couche de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA). Le PMMA du capteur C_1 est de plus fonctionnalisé afin d'obtenir une surface inhibant la formation de biofilm, selon un procédé décrit dans (Dunkirk, S.G. et al., J. Biomater, Appl. 6, 131-156, 1991), par réaction photochimique avec du poly(éthylène glycol) (PEG) ou avec un copolymère de vinylpyrrolidone et de N-(amino-3 propyl) méthacrylamide, substitués par un agent de surface photo activable tel que l'acide benzoyl-4 benzoïque décrit en figure 4. Dans cet exemple, la couche de PMMA fonctionnalisée constitue le revêtement R_1 . La surface de C_0 n'est pas modifiée.

Exemple 3 de dispositif selon l'invention

Dans cet exemple, les capteurs C₀ et C₁ présentent une surface constituée d'oxyde de silicium. La surface de C₁, soigneusement nettoyée, est incubée dans une solution constituée de (III) chlorure de N,N,N-triméthyl-5 3 (triméthoxysilyl)-1 propanaminium (Hüls America Inc., T2925, figure 6) à 10% dans du méthanol pendant 6 heures, lavée au méthanol puis à l'eau désionisée. A l'issue de ce traitement, les groupements ammonium quaternaires, qui possèdent une action bactéricide et fongicide, se trouvent greffés chimiquement à la surface de C₁.

10 D'autres agents de surface, tels que (IV) le bromure de (N,N,N-tributyl)-3 (triméthoxysilyl)-1 propanaminium, (V) le chlorure de (N-diméthyl N-octadécy1)-3 (triméthoxysilyl)-1 propanaminium, (VI) le chlorure de (N-méthyl N,N-didécy1)-3 (triméthoxysilyl)-1 propanaminium, susceptibles d'inhiber la formation de biofilms, peuvent être greffés de façon similaire, 15 leurs formules chimiques sont données en figure 5.

b) Revêtements libérant progressivement un agent antibiotique :

Dans cette approche, la surface du capteur C₁ est revêtue d'un film constitué d'un matériau polymère dans lequel est dispersé un agent antibiotique A (bactéricide, fongicide, etc...). L'antibiotique A diffuse 20 lentement vers la surface et est progressivement relargué dans la phase aqueuse environnante.

Exemple 4 de dispositif selon l'invention

Le revêtement du capteur C₁ est réalisé selon un procédé inspiré de (Golomb, G. and Shpigelman, A., J. Biomed. Mater. Res., 1991, 258), 25 937-952). Un film est déposé par pulvérisation (spray coating) à partir d'une solution de polyuréthane (env. 5 g.l⁻¹) et de propylparaben (1 à 2 g.l⁻¹) dans le THF. Après évaporation du solvant, le film est recuit à 60°C pendant 1 heure.

30 c) Revêtements diminuant l'adhérence des cellules et libérant progressivement un agent antibiotique :

Les deux approches précédentes peuvent être combinées pour réaliser le revêtement du capteur C₁, de façon à en augmenter l'efficacité.

Exemple 5 de dispositif selon l'invention

Le revêtement du capteur C₁ est réalisé en combinant les 35 approches décrites dans les exemples 1 et 4 : un film de polyuréthane est

réalisé selon la méthode décrite dans l'exemple 4. Ce film est ensuite incubé dans une solution de PEG telle que décrite dans l'exemple 1, contenant en outre du propylparaben à saturation. Le film est ensuite trempé rapidement dans l'eau, comme dans l'exemple 1. Le revêtement obtenu présente une 5 surface hydrophile grâce aux chaînes de PEG incorporées au réseau de polyuréthane. De plus, il relargue progressivement du propylparaben, ayant une activité antibiotique à large spectre.

De manière générale, un avantage supplémentaire peut être obtenu en associant au capteur C_0 , non pas un mais n capteurs C_1, \dots, C_n . 10 chacun de ces n capteurs étant muni d'un revêtement par exemple du type décrit en b), les n revêtements R_1, \dots, R_n étant obtenus en incorporant dans une même matrice polymère n agents antibiotiques ayant des spectres d'activité différents. En présence d'une espèce donnée de micro-organisme, la formation de biofilm est plus ou moins inhibée en fonction du revêtement. 15 Le spectre de réponse des $n+1$ capteurs C_0, C_1, \dots, C_n , fournit ainsi une indication de la nature de l'espèce contaminante, analogue à un antibiogramme classique. On peut ainsi plus facilement sélectionner la méthode de désinfection la mieux adaptée.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm se formant sur une surface (S) en contact avec un milieu humide, caractérisé en ce qu'il comprend :
 - au moins deux micro-capteurs (C_0) et (C_1) déposés sur la surface (S), le micro-capteur (C_0) possédant une surface de contact avec le milieu humide, neutre vis-à-vis de la formation de biofilm, le micro-capteur (C_1) possédant une surface de contact avec le milieu humide, munie d'un revêtement (R_1) inhibant la formation de biofilm ;
 - des moyens de mesure différentielle des différents micro-capteurs.
2. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 1, caractérisé en ce que le micro-capteur (C_0) possède une surface de contact avec le milieu humide munie d'un revêtement (R_0) de nature identique à celle de la surface (S).
3. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 2, caractérisé en ce que le revêtement (R_1) comprend un matériau hôte renfermant un agent antibiotique, progressivement relargué dans le milieu humide, le revêtement (R_0) comprenant le même matériau hôte sans agent antibiotique.
4. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le revêtement (R_1) comprend du matériau de type polymère hydrophobe et identique à celui de la surface (S) et des agents tensioactifs ou surfactants diminuant le caractère hydrophobe dudit matériau.
5. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 4, caractérisé en ce que les surfactants sont des copolymères de poly-(oxyde d'éthylène) et poly-(oxyde de propylène).
6. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 4, caractérisé en ce que les surfactants sont des poly-ionènes de type ammonium quaternaire ou phosphonium.
7. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 2, caractérisé en ce que le revêtement (R_0) est constitué d'un matériau polymère hydrophobe et que le revêtement (R_1) comprend un

réseau interpénétré de macromolécules (Mh) dans une matrice de matériau polymère identique à celui du revêtement (R₀).

8. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon la revendication 7, caractérisé en ce que les molécules (Mh) sont des 5^e molécules de poly-(éthylène glycol).

9. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les micro-capteurs sont à ondes acoustiques.

10. Dispositif de détection et de contrôle de biofilm selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend une pluralité de micro-capteurs (C₁), ... (C_i), ... (C_n) munis de revêtements différents (R₁), ... (R_i), ... (R_n) dans lesquels sont incorporés des agents antibiotiques différents, actifs vis-à-vis de différents agents existant dans le biofilm.

1/3

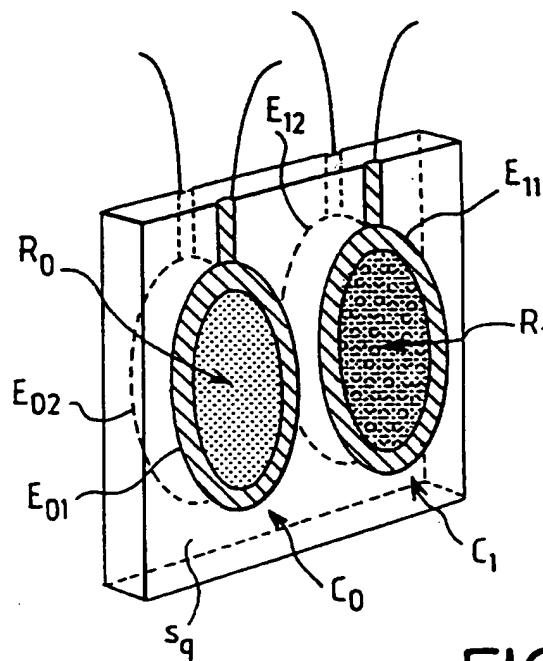


FIG.1

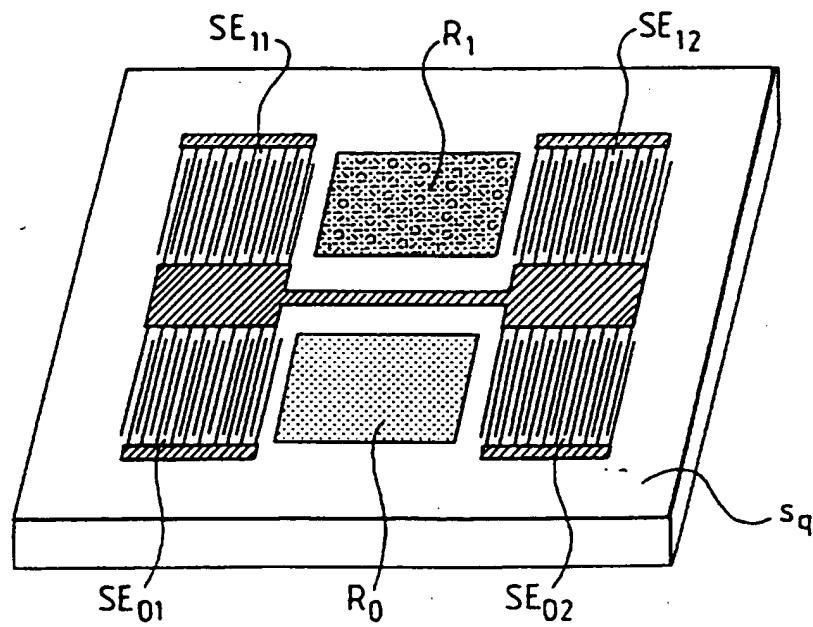


FIG.2

2/3

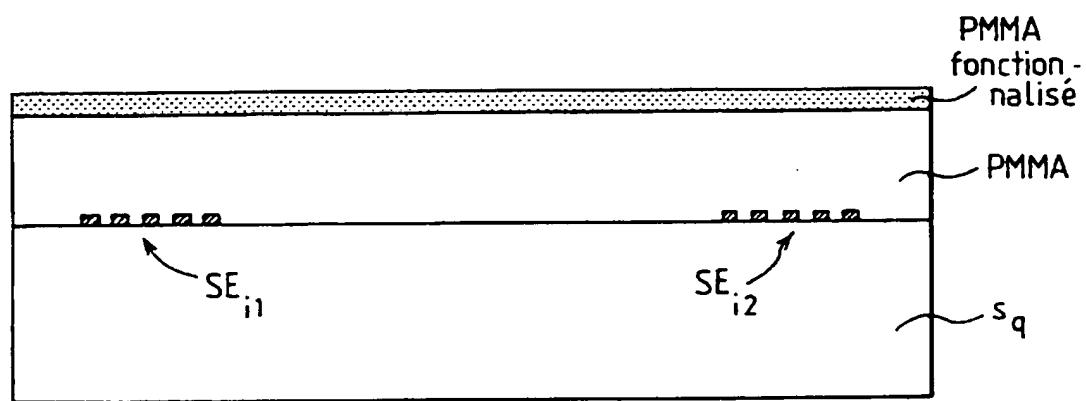


FIG.3

3/3

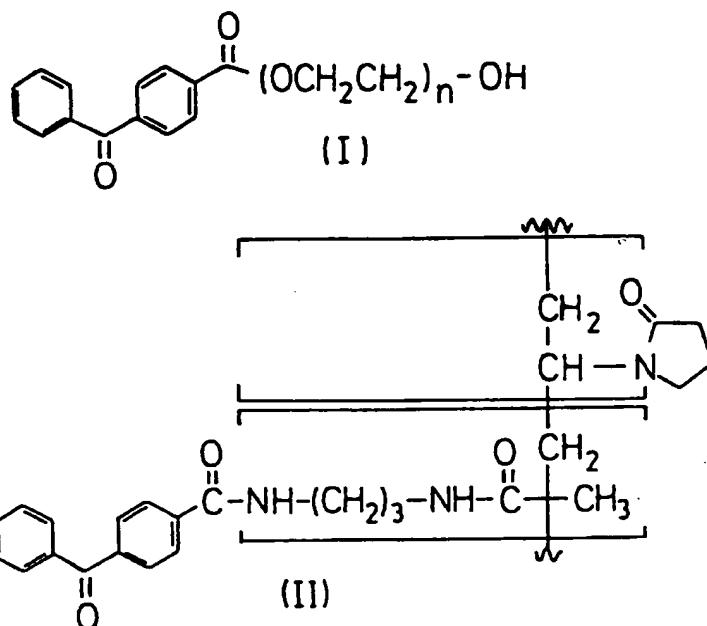


FIG.4

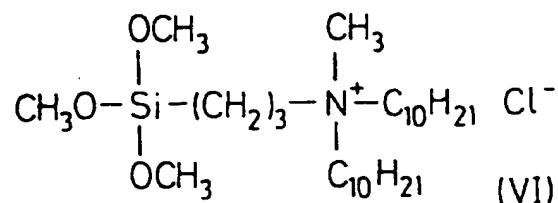
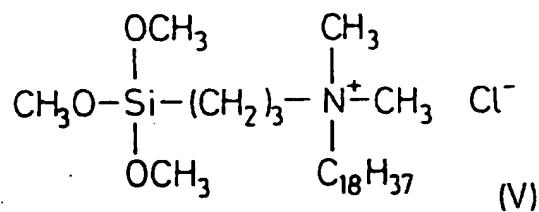
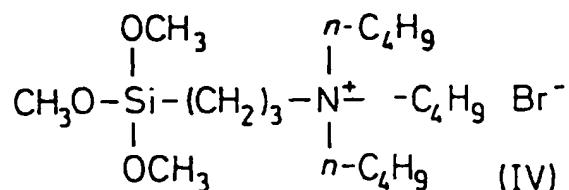
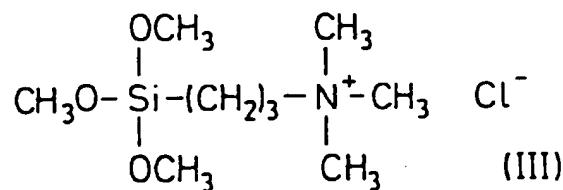


FIG.5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PL/FR 96/01515

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/04 G01N17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	US,A,5 487 981 (NIVENS DAVID E ET AL) 30 January 1996 see column 6, line 21 - line 26 ---	1
X	SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B07, no. 1 / 03, 1 March 1992, pages 602-605, XP000287011 CALIENDO C: "ACOUSTIC LOVE-WAVE SENSOR FOR K+ CONCENTRATION IN H2O SOLUTIONS" see the whole document ---	1-3
X	WO,A,90 05305 (MALMQVIST) 17 May 1990 see page 14 - page 21; claim 1 ---	1
Y	WO,A,89 12644 (ASSOCIATES OF CAPE COD) 28 December 1989 see page 28 ---	1
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 1996

Date of mailing of the international search report

06.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Wells, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int	national Application No.
PCT/FR 96/01515	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,5 324 591 (GEORGER JR JACQUE H ET AL) 28 June 1994 see column 11, line 11, paragraph 20 ---	1
Y	US,A,5 187 980 (BLAIR DIANNA S ET AL) 23 February 1993 see claim 1 ---	1
Y	WO,A,93 07463 (UNIV CALIFORNIA) 15 April 1993 see claim 14 ---	1
Y	SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B08, no. 2, 1 May 1992, pages 191-198, XP000286955 ANDLE J C: "AN ACOUSTIC PLATE MODE BIOSensor*" see the whole document ---	1,2,4
Y	WO,A,91 01381 (DU PONT) 7 February 1991 see page 3, line 19 - page 4, line 11 ---	1
Y	EP,A,0 402 917 (BIOCIRCUITS CORP) 19 December 1990 see column 25, line 24, paragraph 26; claim 1 ---	1,2,4
Y	US,A,5 246 560 (NEKOKSA GEORGE ET AL) 21 September 1993 see column 5, line 46, paragraph 52 ---	1
A	US,A,4 631 961 (YOHE THOMAS L ET AL) 30 December 1986 see the whole document ---	1
A	BIOMATERIALS, vol. 12, 1991, pages 144-153, XP002008348 N.P. DESAI & J.A. HUBBELL: "Solution Technique to IncorporatePolyethylene Oxide..." cited in the application see the whole document -----	1,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PL 1/FR 96/01515

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5487981	30-01-96	NONE	

WO-A-9005305	17-05-90	AT-T- 132975 15-01-96 AT-T- 119671 15-03-95 DE-D- 68921635 13-04-95 DE-T- 68921635 05-10-95 DE-D- 68925426 22-02-96 DE-T- 68925426 22-08-96 EP-A- 0442922 28-08-91 EP-A- 0442930 28-08-91 JP-T- 4501606 19-03-92 JP-T- 4501607 19-03-92 SE-A- 8804074 10-11-88 WO-A- 9005306 17-05-90 SE-A- 8902043 11-05-90 US-A- 5554541 10-09-96 US-A- 5492840 20-02-96	

WO-A-8912644	28-12-89	AU-A- 3772289 12-01-90 DE-D- 68925275 08-02-96 DE-T- 68925275 22-08-96 EP-A- 0379549 01-08-90 EP-A- 0687911 20-12-95 JP-T- 3501733 18-04-91	

US-A-5324591	28-06-94	US-A- 5077085 31-12-91 US-A- 5079600 07-01-92 US-A- 5510628 23-04-96 EP-A- 0506993 07-10-92 US-A- 5389496 14-02-95 US-A- 5500315 19-03-96 US-A- 5391463 21-02-95	

US-A-5187980	23-02-93	NONE	

WO-A-9307463	15-04-93	US-A- 5212988 25-05-93 AU-A- 2663992 03-05-93	

WO-A-9101381	07-02-91	US-A- 5135852 04-08-92 CA-A- 2064188 26-01-91	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01515

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9101381		DE-D- 69003535 DE-T- 69003535 EP-A- 0484384 ES-T- 2060189 JP-T- 4506898	28-10-93 10-02-94 13-05-92 16-11-94 03-12-92
EP-A-0402917	19-12-90	US-A- 5156810 AT-T- 145064 CA-A- 2019039 JP-A- 3128449 US-A- 5427915 US-A- 5491097 US-A- 5571568 US-A- 5268305	20-10-92 15-11-96 15-12-90 31-05-91 27-06-95 13-02-96 05-11-96 07-12-93
US-A-5246560	21-09-93	US-A- 5356521	18-10-94
US-A-4631961	30-12-86	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der de Internationale No
PL/FR 96/01515

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/04 G01N17/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, Y	US,A,5 487 981 (NIVENS DAVID E ET AL) 30 Janvier 1996 voir colonne 6, ligne 21 - ligne 26 ---	1
X	SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B07, no. 1 / 03, 1 Mars 1992, pages 602-605, XP000287011 CALIENDO C: "ACOUSTIC LOVE-WAVE SENSOR FOR K+ CONCENTRATION IN H2O SOLUTIONS" voir le document en entier ---	1-3
X	WO,A,90 05305 (MALMQVIST) 17 Mai 1990 voir page 14 - page 21; revendication 1 ---	1
Y	WO,A,89 12644 (ASSOCIATES OF CAPE COD) 28 Décembre 1989 voir page 28 ---	1
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme amplifiant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Décembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06.01.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax. (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Wells, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document de Recherche Internationale No
PCT/FR 96/01515

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US,A,5 324 591 (GEORGER JR JACQUE H ET AL) 28 Juin 1994 voir colonne 11, ligne 11, alinéa 20 ---	1
Y	US,A,5 187 980 (BLAIR DIANNA S ET AL) 23 Février 1993 voir revendication 1 ---	1
Y	WO,A,93 07463 (UNIV CALIFORNIA) 15 Avril 1993 voir revendication 14 ---	1
Y	SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B08, no. 2, 1 Mai 1992, pages 191-198, XP000286955 ANDLE J C: "AN ACOUSTIC PLATE MODE BIOSENSOR**" voir le document en entier ---	1,2,4
Y	WO,A,91 01381 (DU PONT) 7 Février 1991 voir page 3, ligne 19 - page 4, ligne 11 ---	1
Y	EP,A,0 402 917 (BIOCIRCUITS CORP) 19 Décembre 1990 voir colonne 25, ligne 24, alinéa 26; revendication 1 ---	1,2,4
Y	US,A,5 246 560 (NEKOKSA GEORGE ET AL) 21 Septembre 1993 voir colonne 5, ligne 46, alinéa 52 ---	1
A	US,A,4 631 961 (YOHE THOMAS L ET AL) 30 Décembre 1986 voir le document en entier ---	1
A	BIOMATERIALS, vol. 12, 1991, pages 144-153, XP002008348 N.P. DESAI & J.A. HUBBELL: "Solution Technique to IncorporatePolyethylene Oxide..." cité dans la demande voir le document en entier -----	1,5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à la famille de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 96/01515

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
US-A-5487981	30-01-96	AUCUN		
WO-A-9005305	17-05-90	AT-T- 132975 AT-T- 119671 DE-D- 68921635 DE-T- 68921635 DE-D- 68925426 DE-T- 68925426 EP-A- 0442922 EP-A- 0442930 JP-T- 4501606 JP-T- 4501607 SE-A- 8804074 WO-A- 9005306 SE-A- 8902043 US-A- 5554541 US-A- 5492840	15-01-96 15-03-95 13-04-95 05-10-95 22-02-96 22-08-96 28-08-91 28-08-91 19-03-92 19-03-92 10-11-88 17-05-90 11-05-90 10-09-96 20-02-96	
WO-A-8912644	28-12-89	AU-A- 3772289 DE-D- 68925275 DE-T- 68925275 EP-A- 0379549 EP-A- 0687911 JP-T- 3501733	12-01-90 08-02-96 22-08-96 01-08-90 20-12-95 18-04-91	
US-A-5324591	28-06-94	US-A- 5077085 US-A- 5079600 US-A- 5510628 EP-A- 0506993 US-A- 5389496 US-A- 5500315 US-A- 5391463	31-12-91 07-01-92 23-04-96 07-10-92 14-02-95 19-03-96 21-02-95	
US-A-5187980	23-02-93	AUCUN		
WO-A-9307463	15-04-93	US-A- 5212988 AU-A- 2663992	25-05-93 03-05-93	
WO-A-9101381	07-02-91	US-A- 5135852 CA-A- 2064188	04-08-92 26-01-91	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à la famille de brevets

Document de Internationale No

PLI/FR 96/01515

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9101381		DE-D- 69003535 DE-T- 69003535 EP-A- 0484384 ES-T- 2060189 JP-T- 4506898	28-10-93 10-02-94 13-05-92 16-11-94 03-12-92
EP-A-0402917	19-12-90	US-A- 5156810 AT-T- 145064 CA-A- 2019039 JP-A- 3128449 US-A- 5427915 US-A- 5491097 US-A- 5571568 US-A- 5268305	20-10-92 15-11-96 15-12-90 31-05-91 27-06-95 13-02-96 05-11-96 07-12-93
US-A-5246560	21-09-93	US-A- 5356521	18-10-94
US-A-4631961	30-12-86	AUCUN	